

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/059322 A1

(51) Classification Internationale des brevets⁷ :
G01N 33/68, C12Q 1/37

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2003/003857

(22) Date de dépôt international :
19 décembre 2003 (19.12.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/16383 20 décembre 2002 (20.12.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
AGENCE FRANCAISE DE SECURITE SANITAIRE
DES ALIMENTS-AFSSA- [FR/FR]; 27-31 avenue
du Général Leclerc, f-94701 Maisons-Alfort (FR).
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE-CNRS- [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
f-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON [FR/FR]; 43, boulevard du 11
Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR).
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280
Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MOUSSA,
Aly [FR/FR]; 52, chemin du Grand Revoyet, f-69600
Oullins (FR). COLEMAN, Anthony, William [GB/FR];
55, rue de Margnolles, F-69300 Calluire-Et-Cuire (GB).
SHAHGALDIAN, Patrick [IR/FR]; 223, rue André
Philip, f-69003 Lyon (IR). DA SILVA, Eric [FR/FR]; 20,
rue Camille Roy, f-69007 Lyon (FR). MARTIN, Am-
brolse [FR/FR]; 605c, route du Bas Privas, f-69390 Charly
(FR). LAZAR, Adina, Nicoleta [RO/FR]; Résidence
Benjamin Delessert, Chambre 312, 145, avenue Jean
Jaurès, f-69007 Lyon (RO). LECLERE, Edwige [FR/FR];

12, rue des Pierres Plantées, f-69001 Lyon (FR). DUPIN,
Marilyne [FR/FR]; Chatanay, f-69670 Vaugneray (FR).
PERRON, Hervé [FR/FR]; 4, allée de la Guignonnière,
f-69290 Saint-Genies-Les-Ollières (FR).

(74) Mandataire : BREESE, Pierre / MAJEROWICZ,
Marc; Breesé-Majerowicz, 3 Avenue de l'Opéra, F-75001
Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(48) Date de publication de la présente version corrigée:
14 juillet 2005

(15) Renseignements relatifs à la correction:
voir la Gazette du PCT n° 28/2005 du 14 juillet 2005, Sec-
tion II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

WO 2004/059322 A1

(54) Title: PRP DETECTION METHOD USING AN ANCILLARY MACROCYCLIC LIGAND

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE LA PRP UTILISANT UN LIGAND ADJUVANT MACROCYCLIQUE.

(57) Abstract: The invention relates to a method of detecting pathogenic forms of the prion responsible for transmissible subacute spongiform encephalopathies. The inventive method is characterised in that an ancillary macrocyclic ligand (AML) which is free or bound to a support is added to a biological sample that may contain PrP^{sc}, the resulting suspension is reacted with an anti-PrP^{sc} antibody and the presence of PrP is detected.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de détection des formes du prion pathogènes responsables des encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP^{sc}, un ligand adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP^{sc}, et on détecte la présence de PrP.

**PROCEDE DE DETECTION DE LA PRP UTILISANT UN LIGAND
ADJUVANT MACROCYCLIQUE.**

La présente invention concerne un procédé de détection des formes du prion pathogènes responsables des
5 encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles.

La protéine prion native ou normale, désignée PrP ou PrP^c pour la protéine prion cellulaire, est une glycoprotéine largement exprimée dans les cellules lymphoïdes et neuronales des mammifères.

10 Des changements conformationnels de PrP^c conduisent à l'apparition et à la propagation de la protéine pathogène PrP^{sc} qui est résistante à la protéinase K. Cette protéine pathogène peut être appelée PrP^{sc} ou PrP^{res} indifféremment. L'accumulation de PrP^{sc} dans les organes des animaux est à
15 l'origine de nombreuses maladies et notamment de la tremblante des petits ruminants, de la maladie cachectisante chronique (ou chronic wasting disease 'CWD') de l'élan et de l'antilope, de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MCJ) chez l'homme.

20 L'apparition tardive après une période d'incubation de 2 à 6 ans et le lent développement des symptômes chez le bétail infecté par l'ESB a considérablement ralenti le développement de modèles épidémiologiques. L'ESB est transmissible par ingestion à l'homme et a conduit à
25 l'apparition d'une nouvelle forme de la maladie de Creutzfeld-Jakob (vMJC).

La détection de la protéine pathogène PrP^{sc} est difficile chez les animaux infectés sains avant le développement de la maladie et surtout dans le sang et
30 l'urine chez les animaux malades. Il est à présent établi que la PrP^{sc} présente chez les animaux destinés à l'alimentation humaine se transmet à l'homme lors de l'ingestion des tissus infectés. Un objectif majeur de santé

publique est donc d'éviter cette transmission en détectant la présence de la PrP^{sc} :

- chez des animaux destinés à la consommation humaine en vue de les retirer de la chaîne alimentaire,
- 5 - dans les dons de sang et dérivés sanguins destinés à la transfusion chez l'homme. En effet, comme le montre une présence de protéine pathogène PrP^{sc} dans le sang et les liquides lymphoïdes bien avant l'atteinte cérébrale, et donc bien avant la possibilité de déceler des signes
- 10 neurologiques évocateurs de maladie à prions cliniquement déclarée, la physiopathologie chez l'homme est méconnue et, ne pouvant réaliser des infections expérimentales comme chez le mouton, l'absence de test de détection dans le sang ou d'autres fluides biologiques ne permet pas de l'étudier et
- 15 donc de prévenir une transmission interhumaine par don de sang, ou de traiter les personnes infectées avant que les lésions cérébrales n'aient débuté ; et
- dans les troupeaux animaux avant le stade neurologique, permettant ainsi d'éliminer les animaux
- 20 infectés précocement, avant arrivée aux abattoirs.

La détection de la présence de PrP^{sc} dans des échantillons biologiques ou chez des animaux devient donc d'une extrême importance et plusieurs équipes de chercheurs développent des méthodes de détections immunologiques

25 (WO02/086511). Par ailleurs, des méthodes pour complexer à la PrP^{sc} des peptides, des petites molécules ou des inhibiteurs en vue du traitement de vMJC font l'objet de recherches actives. Toutefois, les méthodes en l'état de la technique se heurtent sans arrêt à la difficulté

30 d'identifier la PrP^{sc} de manière fiable lorsqu'elle est en faible quantité dans un échantillon biologique, et notamment dans les fluides biologiques.

La présente invention a donc pour objet un procédé permettant de détecter la protéine PrP et notamment PrP^{sc} à

des dilutions où elle n'est pas détectable avec les méthodes utilisées actuellement, cette détection étant d'une fiabilité de 100 % sur les 119 échantillons testés par les inventeurs. Avantageusement, le procédé selon l'invention
5 permet d'amplifier d'un facteur 4 la détection de la PrP^{sc}.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc}, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP, un ligand
10 adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP, puis on identifie la présence de PrP.

La liaison du ligand macrocyclique au support peut être mise en œuvre de façon connue de l'homme du métier, telle que par adsorption ou liaison covalente, la liaison
15 covalente, autrement appelée greffage, étant préférée.

Lorsqu'on cherche à détecter la PrP^{sc}, la présente invention peut également comprendre l'étape supplémentaire de traitement de l'échantillon avec de la protéinase K avant
20 ou après contact avec l'AML.

La présente de PrP peut être mise en œuvre par détection de la réaction anticorps anti-PrP/PrP, et ce par tout moyen connu de l'homme du métier, et notamment par méthode sandwich telle que ELISA, immunoblotting, immuno
25 micro-cantilever détection, spectrométrie de masse ou par des analyses optiques et spectroscopiques. L'identification du complexe AML-PrP s'effectue au moyen de techniques de balayage profilométrique telles que la microscopie à réflectance de balayage, la microscopie de balayage en champ
30 proche ou la microscopie de balayage confocale.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'échantillon biologique provient d'un animal, y compris l'homme. De préférence, cet échantillon provient du cerveau, des tissus du système nerveux central, ou des organes, et

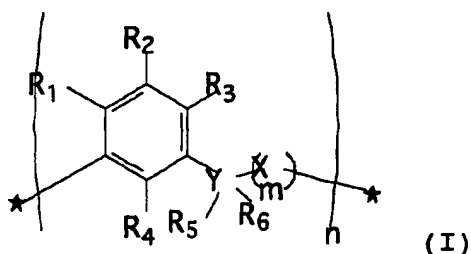
notamment la rate ou l'intestin. Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, cet échantillon est un fluide biologique, notamment le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.

5 Par ligand macrocyclique, on entend un composé capable de se lier à la PrP, et en particulier à la PrP^{sc} et qui est constitué d'une succession de cycles formant un macrocycle. Les ligands macrocycliques sont connus de l'homme du métier. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer les
10 cyclophanes, les métacyclophanes, les cyclodextrines, les cyclo(tétra-acides chromotropiques), les sphérands et les cyclo[n]vératrylènes.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique est capable de se lier à des sites contigus, ou proches dans
15 l'espace, de sites de liaison avec un anticorps et a pour action d'augmenter la liaison anticorps-PrP^{sc}.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des métacyclophanes. Parmi les métacyclophanes, les para-sulfonato-calix-arènes
20 fonctionnalisés sur la face phénolique sont particulièrement avantageux. Ces composés peuvent être obtenus suivant la méthodologie décrite dans Da Silva et al., J. Supramol. Chem 1, (2001), 135-138.

Avantageusement, le ligand adjuvant macrocyclique
25 répond à la formule générale (I) ci-dessous,



dans laquelle

R_1 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

R_2 représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol, CH_2 Pol, dans lesquels Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

R_3 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

R_4 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe OCH_2R ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de soufre,

R_5 et R_6 , chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH_2 ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

R_5 et R_6 représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

X représente un groupement CH_2 ou un atome d'oxygène ou de soufre,

m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R_1 à R_6 , R, X, Y et l'entier m peuvent être de nature différente suivant les motifs.

Ainsi, le composé de formule (I) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle benzénique, et les substituants de ce

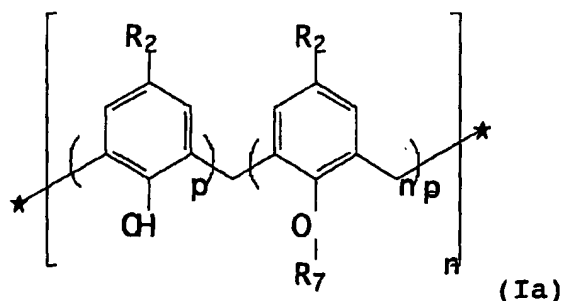
cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Les ligands macrocycliques peuvent être préparés selon les techniques connues de l'homme du métier, par exemple
5 décrites dans Comprehensive Supramolecular Chemistry, Pergamon, Oxford, 1996.

Les chaînes hydrocarbonées, saturées ou non, ramifiées ou non, cycliques ou non cycliques, substituées ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou
10 non polaires, sont largement connues de l'homme du métier. A titre d'exemples, on peut citer les alkyles, les alcènes, les aryles et les cycles saturés tels que le cyclohexane. Un exemple de groupement non polaire est CF₃ et des exemples de groupements polaires sont les substituants Pol tels que
15 définis précédemment.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, le ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessus, et plus précisément à la formule générale (Ia) ci-dessous

20



dans laquelle

chaque groupement R₂, pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

25 R₇ est un groupement (CH₂)_r-Z dans lequel Z est un groupement COOEt, COOH, CN ou NH₂,

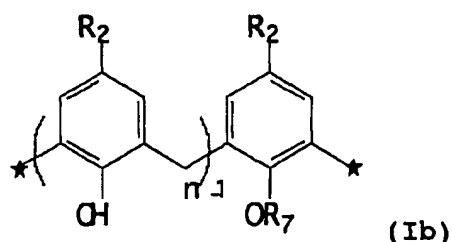
r est un entier compris entre 1 et 20,

p est un entier compris entre 1 et 10,

n est un entier compris entre 2 et 10.

Suivant un mode de réalisation préféré de l'invention, le ligand adjuvant macrocyclique est le p-sulphonato-calix-[4]-arène, le p-sulphonato-calix-[6]-arène, le p-sulphonato-calix-[8]-arène, ou l'un de leurs dérivés.

Suivant un second mode de réalisation de l'invention, le ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessus, et plus précisément à la formule générale (Ib) ci-dessous



dans laquelle n est un entier compris entre 4 et 8, chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

15 R_s représente un groupement $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$ ou un groupement $(CH_2)_t-COOH$ où t est un entier compris entre 0 et 6 et s est un entier compris entre 0 et 6.

Avantageusement, le calix-arène de formule (Ib) est tel que les deux groupements R_2 sont chacun un groupement sulfate, n est 4, 6 ou 8, et R_s est un atome d'hydrogène, un groupement CH_2COOH , un groupement CH_2CONH_2 ou un groupement $CH_2CH_2NH_2$.

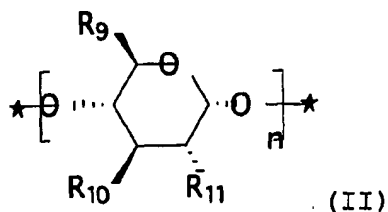
De préférence, le calix-arène de formule (Ib) est tel que tel que les deux groupements R_2 sont chacun un groupement sulfate, n est un entier égal à 6, et R_s est un groupement $(CH_2)_2-NH_2$.

Suivant un mode de réalisation particulier de l'invention, le ligand selon l'invention est greffé sur un support solide. Ce support est fonctionnalisé par une

fonction susceptible de former une liaison avec une fonction portée par le ligand. Suivant un mode de réalisation préféré, le support solide est fonctionnalisé par une liaison NHS (N-hydroxysuccinimide) ou par une fonction NH_2 .
 5 Cette fonction peut réagir avec une fonction portée sur le ligand. Dans ce mode de réalisation, les calix-arènes portant une fonction susceptible de réagir pour former une liaison avec la liaison fonctionnelle du support solide, notamment les calix-arènes portant une liaison NH_2 ou COOH ,
 10 sont particulièrement préférés.

L'invention a également pour objet un ligand adjuvant macrocyclique greffé sur un support fonctionnalisé, dans lequel le ligand répond à la formule (Ib) telle que définie ci-dessus, dans laquelle n est un entier compris entre 4 et
 15 8, et le support est du type support solide de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH_2 et est de préférence une bille magnétique ou une microplaque. Un tel greffage préserve l'interaction ultérieure entre la protéine et le ligand, ainsi que la présentation stéréochimique de
 20 l'épitope pour la détection par un anticorps anti-PrP, les sites ciblés par le greffage sur le support étant différents de ceux qui servent à l'interaction avec la PrP.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la
 25 famille des cyclodextrines et en particulier des cyclodextrines répondant à la formule générale (II)



dans laquelle

R_9 représente un atome d'hydrogène ou un groupement CH_2 , OH , OR , OCOR , COR , CH_2Pol , OCH_2R , SR , NR , Pol et R étant ci-dessous définis,

R_{10} et R_{11} , chacun indépendamment, représentent un
 5 atome d'hydrogène ou un groupement CH_2 , OH , OR , OCOR , COR , CH_2Pol , OCH_2R , Pol et R étant ci-dessous définis,

Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium ou acide carboxylique,

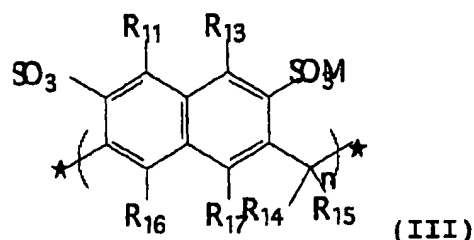
R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non,
 10 ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 6 et 8,

les substituants R_9 à R_{11} peuvent être de nature
 15 différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (II) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les substituants de ce cycle peut être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

20 Selon une variante de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des cyclo-tétra-acides chromotropiques, et en particulier aux cyclo-tétra-acides chromotropiques répondant à la formule générale (III)

25



dans laquelle

R_{12} et R_{13} , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe R ou Pol tels que définis ci-dessous,

R_{14} et R_{15} , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH_2 ou un groupe R tel que défini ci-dessous, ou bien

R_{14} et R_{15} représentent ensemble un atome d'oxygène ou de soufre,

R_{16} et R_{17} , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe hydroxyle ou un groupe OR, OCH_2R , $OCOR$, SR , SCH_2R , $SCOR$, R étant tel que défini ci-dessous,

M représente un atome d'hydrogène, ou un atome choisi parmi Na, K, Li, Cs, Rb, Mg et Ca,

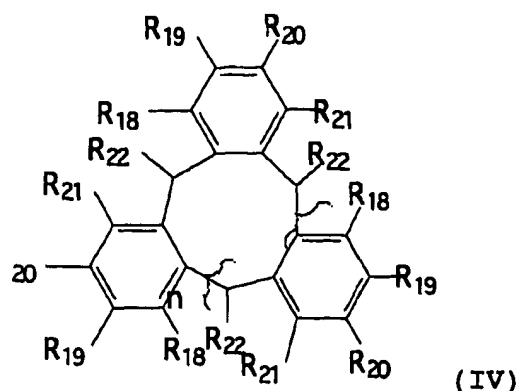
Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine, ammonium ou acide carboxylique,

R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R_{12} à R_{17} , M, Pol, et R peuvent être de nature différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (III) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ledit ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des cyclo[n]veratrylenes, répondant à la formule générale (IV)



dans laquelle

R_{18} représente un atome d'hydrogène ou un groupement CH_2 , OH , OR , OCOR , COR , CH_2Pol , OCH_2R , SR , NR , Pol et R étant

5 ci-dessous définis,

R_{19} , R_{20} , R_{21} et R_{22} , chacun indépendamment, représentent un atome d'hydrogène ou un groupement CH_2 , OH , OR , OCOR , COR , CH_2Pol , OCH_2R , Pol et R étant ci-dessous définis,

Pol représente un groupe phosphate, sulfate, amine,

10 ammonium ou acide carboxylique,

R représente une chaîne hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

15 n est un entier compris entre 1 et 10,

les substituants R_{18} à R_{22} , R , Pol et R peuvent être de nature différente suivant les motifs. Ainsi, le composé de formule (IV) se présente sous forme d'une succession de n motifs caractérisés par la présence d'un cycle, et les

20 substituants de ce cycle peuvent être variables d'un motif à l'autre, dans la limite de leurs définitions ci-dessus.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique (AML) pour la détection du prion PrP^{sc} dans un échantillon biologique,

25 et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) ci-dessus, libre ou lié à un support.

L'invention a également pour objet un kit de diagnostic des maladies dont la PrP^{sc} est responsable, du type ESB, la tremblante des petits ruminants, Creutzfeld-Jakob, caractérisé en ce qu'il comprend l'utilisation du
5 ligand adjuvant macrocyclique et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) ci-dessus, libre ou lié à un support.

L'invention a également pour objet un kit de dosage immunologique de la PrP^{sc} caractérisé en ce qu'il comprend
10 l'utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) ci-dessus, libre ou lié à un support.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent
15 concernant l'amplification de la détection de la PrP^{sc} lorsque l'échantillon biologique est mis en présence d'un ligand adjuvant macrocyclique, libre ou greffé.

Il sera fait référence dans ces exemples aux dessins en annexe dans lesquels :

20 En référence à l'exemple 1 :

- la figure 1 est un exemple comparatif de la détection par immunoblotting de PrP^{sc} d'une part dans un échantillon mis en présence d'un ligand adjuvant macrocyclique spécifique (AML1) dont la préparation est
25 décrite ci-après et, d'autre part, dans un échantillon non mis en présence d'AML1;

- la figure 2 représente les courbes de densité optique de détection de PrP^{sc} d'une part dans un échantillon mis en présence d'AML1 et, d'autre part, dans un échantillon
30 non mis en présence d'AML1 ;

- la figure 3 montre des images en microscopie de sonde à balayage (SPM) en mode non-contact pour des films séchés de la protéine prion recombinante (recPrP) seule (A), de recPrP en présence d'AML1 (B) et d'AML1 seul (C) ;

- la figure 4 montre des images en microscopie de sonde à balayage (SPM) en mode non-contact pour des films séchés de recPrP en présence d'AML dans différentes proportions : 1/1000 AML1/recPrP, 1/100 AML1/recPrP, 1/10 AML1/recPrP.

- la figure 5 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) après incubation d'une solution de PrP recombinante bovine et révélation par l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la peroxydase,

- la figure 6 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en calix-arène C6S greffé sur une bille amine activée (NHS) après incubation d'une solution de PrP recombinante humaine dosée à 0,25 µg/ml par révélation directe avec l'anticorps anti-PrP 8D11G12 marqué à la peroxydase,

- la figure 7 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues après incubation avec une gamme de dilution de sérum humain dans du PBST 0,05% mise en contact avec du calix-arène C6S greffé sur une bille amine activée (NHS), par révélation directe avec l'anticorps anti-PrP 8D11G12 marqué à la peroxydase,

- la figure 8 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) avec des échantillons de liquide céphalo-rachidien humains positifs (LCR+) et négatifs (LCR-) pour la MJC en fonction du chauffage, par révélation avec l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la phosphatase alcaline,

- la figure 9 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine

activée (NHS) avec de la PrP^{sc} extraite de cerveaux de patients atteints ou non de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MJC+/MJC-), par révélation avec l'anticorps anti-PrP AC23 marqué à la phosphatase alcaline,

5 - la figure 10 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) après mise en contact avec un échantillon de LCR de patient non atteint de MJC, dilué au
10 1/2 ou au 1/6, et en l'absence de digestion par la protéinase K,

 - la figure 11 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration de calix-arène C6S greffé sur
15 une plaque amine activée (NHS) après mise en contact avec un échantillon de LCR de patients non atteints de MJC (LCR-) ou atteints de cette maladie (LCR+), éventuellement dilué au 1/2 (LCR+1/2 ou LCR-1/2), en l'absence de digestion par la protéinase K, et

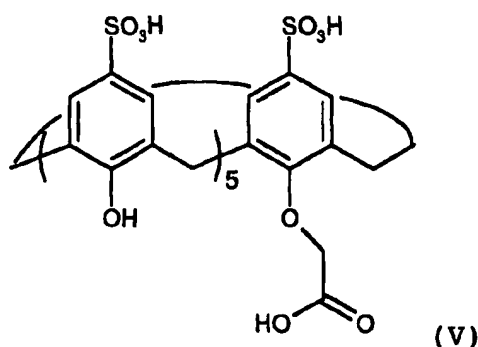
20 - la figure 12 est une représentation graphique donnant les valeurs de densité optique (DO) obtenues en fonction de la concentration en protéinase K après mise en contact de calix-arène C6S greffé sur une plaque amine activée (NHS) avec un échantillon de LCR de patients non
25 atteints de MJC (LCR-) ou atteints de cette maladie (LCR+),

Exemple 1 : Préparation des ligands adjuvants macrocycliques

1.1 Préparation du p-sulphonato-3,7-(2-carboxy-methyloxy)-calix-[6]-arène (dénommé AML 1)

30

Ce ligand adjuvant macrocyclique AML1 possède la formule générale (V) :

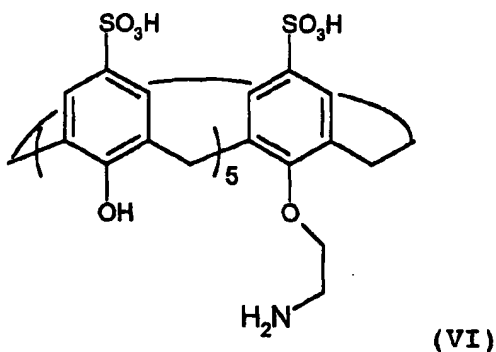


Ce ligand est synthétisé comme suit : une suspension de calix[6]arène dans l'acétonitrile en présence d'un équivalent de base (K_2CO_3) est agitée à reflux. Après 30 minutes, 0,5 équivalent d'agent alkylant (bromo-acétate d'éthyle) sont ajoutés dans le mélange réactionnel qui est maintenu à reflux et sous agitation pendant 24 heures. Après refroidissement de la suspension, le solvant est évaporé sous pression réduite et le solide résultant est dissous dans 200 mL de CH_2Cl_2 et lavé deux fois avec une solution d'acide chlorhydrique (1M) et une fois avec de l'eau déminéralisée. Après avoir été séché sur sulfate de magnésium ($MgSO_4$) le solvant organique est évaporé sous pression réduite et permet l'obtention d'une poudre blanche. Celle-ci est purifiée sur une colonne de chromatographie de silice (éluant : CH_2Cl_2 :hexane; 4 :1). Le produit purifié est analysé en RMN du 1H , ^{13}C et en spectrométrie de masse electrospray. La saponification de l'ester carboxylique est réalisée par l'hydroxyde de potassium en solution dans un mélange eau : éthanol (30:70) sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le précipité formé est filtré puis lavé avec 50 mL d'acide chlorhydrique (1M) et 50 mL d'eau, puis purifié sur colonne de chromatographie de silice (éluant chloroforme : méthanol : acide acétique ; 95 :5 : 0.1%) et permet d'obtenir, après évaporation du solvant, un solide blanc et cristallin. Ce produit est analysé en RMN du 1H , ^{13}C et en spectrométrie de masse electrospray. La

sulfonation est réalisée par un traitement avec l'acide sulfurique à 50°C pendant 24 heures. Le produit est précipité avec de l'éther et permet d'obtenir l'AML1 sous forme d'une poudre blanche cristalline.

5 1.2 Préparation du p-sulphonato-3,7-(2-amino-éthoxy)-calix-[6]-arène (dénommé C6S)

Ce ligand adjuvant macrocyclique C6S possède la formule générale (VI) :



10 Ce ligand est préparé selon la méthode décrite dans Eric Da Silva et Anthony W. Coleman, Synthesis and complexation properties towards amino acids of mono-substituted p-sulphonato-calix-[n]-arene, Tetrahedron 59 (2003) 7357-7364.

15

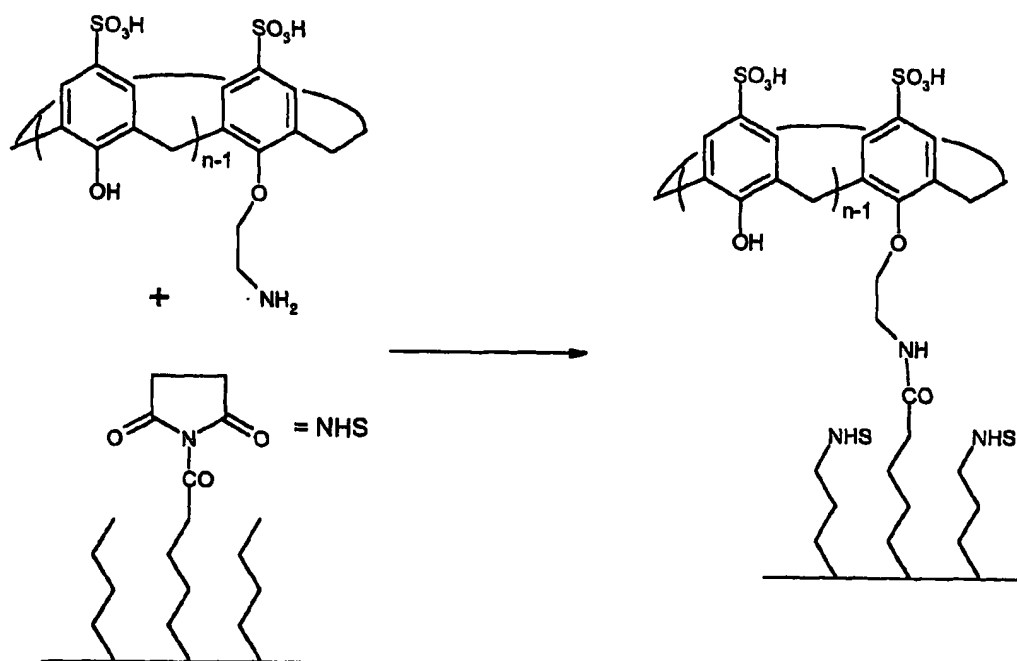
1.3 Greffage du Ligand C6S sur plaques et sur billes

Ce ligand est couplé avec un support solide (bille ou plaque) portant une surface activée.

Greffage sur plaque :

20 Les plaques « NHS activated plates » de 96 puits proviennent de la société Covalab (Lyon, France). 100µL d'une solution de ligand sont dissous à différentes concentrations dans du Tampon Phosphate 50mM pH 8,2. Les puits sont lavés 3 fois (3 x 200µL) à l'eau MilliQ après
25 deux heures d'incubation à 37°C. Les plaques sont séchées à température ambiante avant leur utilisation.

Schéma de greffage :



Plusieurs plaques ont été faites à différentes concentrations en ligand C6S. Ces plaques sont définies
 5 comme « plaques C6S » dans tout le texte.

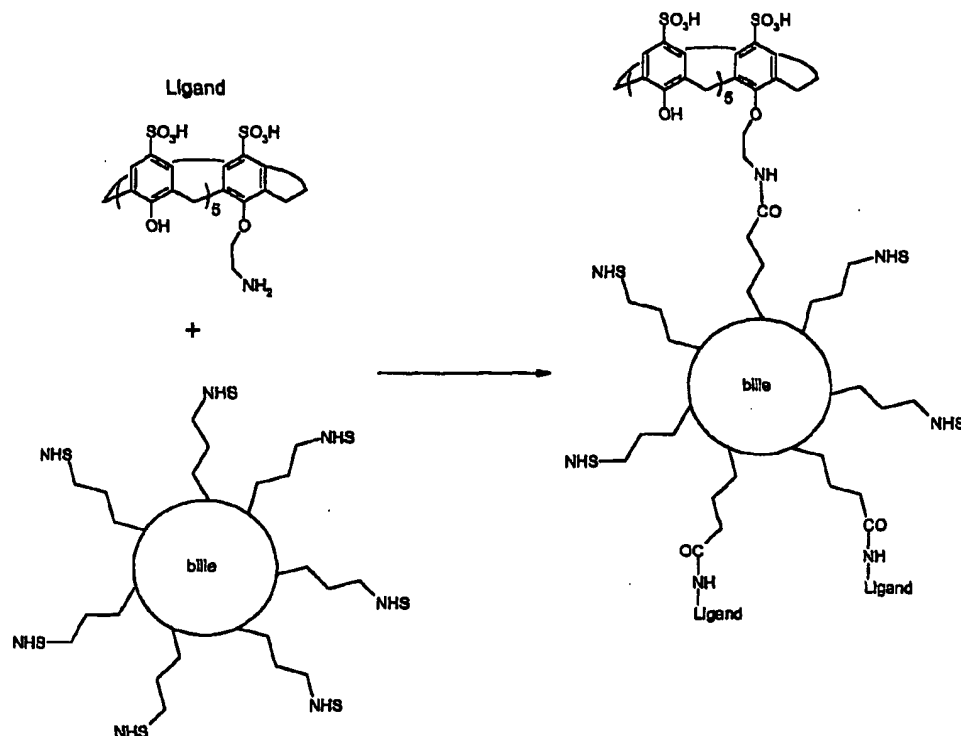
Greffage sur billes :

4 mL d'une solution de bille activée NHS (2×10^9 billes /mL ; Dynabeads® M270Amine, Société Dynals, Norvège) sont aliquotés en tubes de 1 mL. Les billes sont
 10 centrifugées et précipitées par aimantation. Le surnageant est enlevé et les billes sont lavées 3 fois avec 1 mL d'eau. Le culot de bille est repris avec différents volumes de solution de calixarène dans un tampon phosphate 50mM pH 8,2.
 600 μL , 120 μL , 60 μL et 12 μL d'une solution de ligand à 50
 15 mg/mL (tampon phosphate 50mM, pH 8,2) sont ajoutés. Les billes sont agitées pendant 24 heures à température ambiante. Les billes sont lavées 3 fois avec de l'eau MilliQ 18 Ω afin d'éliminer le ligand qui n'a pas réagi. Les billes sont conservées dans 1 mL d'eau afin de reconstituer la
 20 concentration initiale de 2×10^9 billes / mL. La solution

de bille est prête à l'emploi. Ces billes sont définies comme « billes C6S » dans tout le texte.

Schéma de greffage du C6S sur les billes :

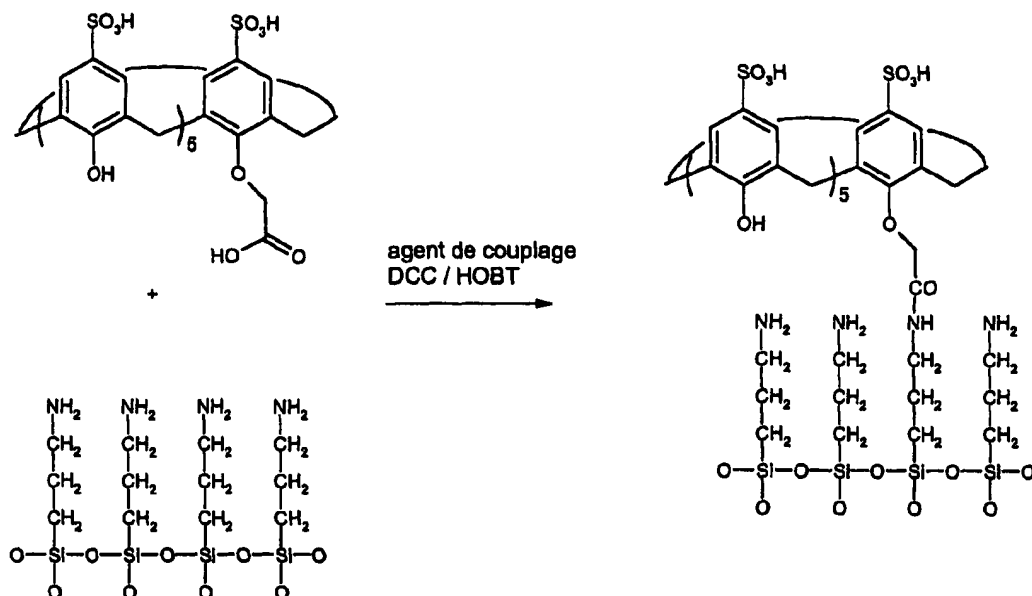
5



1.4 Greffage de AML1 sur une surface minérale modifiée

1 mL de 3-Aminopropyltri-methoxysilane (Société ABCR) est mis en solution dans une solution de 50mL (95% Ethanol et 5% H_2O) pendant 5 min. la plaque de silicium est plongée dans cette solution pendant 4 min sous agitation. On rince la plaque de silicium avec de l'éthanol puis la plaque est mise à sécher à 130°C pendant 15 min. 10 μL de AML1 en solution 0,1M dans le DMSO ont été couplés sur une plaque de silicium modifiée en utilisant un agent de couplage (DCC/HOBT). L'échantillon a été séché pendant 12 heures à 23°C .

Schéma de couplage :



**Exemple 2 : Détection de PrP en utilisant l'AML1 non
5 couplé à un support solide**

2.1 Préparation des échantillons

Les échantillons qui ont servi à la réalisation des exemples des figures 1 et 2 ont été préparés comme suit :

Echantillon sans AML : 0,5g de tissu de cerveau est
10 broyé dans 4,5 mL de solution glucose 5 % pour obtenir une suspension à 10% en poids/volume. Pour 100 μl d'homogénat de cerveau à 10 % dans du glucose à 5 % (équivalent à 10 mg de cerveau) est ajoutée 1 μg de protéinase K (Boehringer) dans 10 μl . La solution est mise sous vortex et incubée à 37°C
15 pendant une autre heure. Après avoir ajouté 100 μl de tampon Laemmli dénaturant, on chauffe 5 minutes à 100 °C, on centrifuge à 12000 G pendant 5 mn, et on récupère les surnageants pour les faire migrer sur SDS PAGE.

Echantillon avec AML : 0,5g de tissu de cerveau est
20 broyé dans 4,5 mL de solution glucose 5 % pour obtenir une suspension à 10% en poids/volume. Pour 100 μl d'homogénat de cerveau à 10 % dans du glucose à 5 % (équivalent à 10 mg de

cerveau), on ajoute 1 µl d'AML 0,1M. Après une heure à 37°C, 1,5 µg de protéinase K (Boehringer) dans 10 µl est ajoutée. La solution est mise sous vortex et incubée à 37°C pendant une autre heure. Après avoir ajouté 100 µl de tampon Laemmli
5 dénaturant, on chauffe 5 minutes à 100 °C, on centrifuge à 12000 G pendant 5 mn, et on récupère les surnageants pour les faire migrer sur SDS PAGE.

2.2 Procédé de détection par immunoblotting

Après migration sur un gel d'électrophorèse
10 unidimensionnelle de 15% de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS PAGE) comme décrit par Laemmli, Nature 227 (1970), 680-685, les protéines sont transférées par électrophorèse sur des membranes nitrocellulose et immunoblottées à température ambiante pendant 60 minutes
15 avec un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope spécifique constitué des acides aminés 126-160. L'anticorps secondaire (1/5000) est un anticorps de chèvre dirigé contre les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines de souris conjuguées à la peroxydase de raifort (IgG H+L).

20 Les blots sont ensuite lavés et les signaux sont détectés par chimioluminescence soit avec un kit ECL (Amersham) sur des films (Biomex light, Kodak) ou avec un super Signal Ultra (Pierce) et visualisation sur Fluor S. Multimager (BioRad).

25 La figure 1 est un exemple comparatif qui montre que la détection du prion est amplifiée au moins quatre fois lorsque le procédé de l'invention est mis en œuvre, par rapport à la détection de la même protéine en absence d'AML1. En absence d'AML1, pour des dilutions supérieures au
30 1/8°, aucune PrP^{sc} n'est détectée. En présence d'AML, la détection de la PrP^{sc} dans le même échantillon est possible jusqu'à une dilution au 1/32°. Les résultats de la figure 2 montrent la détection.

2.3 Résultats de microscopie

Les échantillons qui ont servi pour les expériences en microscopie de sonde à balayage reportées dans les figures 3 et 4 ont été préparés comme suit :

Echantillons contenant du ligand adjuvant macrocyclique uniquement : des échantillons contenant du ligand adjuvant macrocyclique (50 mM) sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement clivé de 10 µl de solution d'AML respectivement et de 10 µl d'eau et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

Echantillons contenant de la protéine PrP recombinante (recPrP) uniquement : des échantillons contenant du recPrP (50 mM) sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement coupé de 10 µl de solution de 1/10 (v/v) AML1/recPrP, 1/100 (v/v) AML1/recPrP et 1/1000 (v/v) AML1/recPrP respectivement et de 10 µl d'eau et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

Echantillons comprenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique et du recPrP : 1) des échantillons contenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement clivé de 1 µl de solution d'AML et de 1000 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C ; 2) des échantillons contenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique (AML1) et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement coupé de 1 µl de solution d'AML et de 100 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C ; 3) des échantillons contenant à la fois du ligand adjuvant macrocyclique et du recPrP sont préparés par dépôt sur du mica fraîchement coupé de 1 µl de solution d'AML et de 10 µl de recPrP respectivement et sont séchés pendant 24 heures à 37°C.

On effectue une analyse par imagerie au moyen d'un Thermomicroscope Explorer AFM équipé avec un scanner trépié 100 μ m, en mode non-contact, utilisant des fréquences de résonance élevées ($F_0 = 320$ kHz) de cantilever pyramidal avec des sondes silicones à une fréquence de balayage de 1 Hz. Le traitement des images est réalisé avec le logiciel SPMLab 5.1 et présentées non-filtrées.

Il ressort des figures 3 et 4 que les films de recPrP seuls montrent une structure en agrégats circulaires caractéristique. En présence d'AML, les structures observées pour le recPrP sont modifiées séquentiellement, sont fonction croissante de la quantité d'AML et montrent des motifs arrondis et éventuellement cristallite orthogonal. Les images du ligand adjuvant macrocyclique seul (AML1) montrent des structures ressemblantes, mais en plus petites, aux motifs des films recPrP- AML.

D'autres expériences ont été réalisées par microscopie à force atomique.

Une analyse ultérieure par analyse de surface de la rugosité est donnée dans le tableau I. L'utilisation de ces mesures de rugosité peut être étendue à des techniques d'analyses profilométriques.

TABLEAU 1

| | AML seul | AML/ recPrP 1/1000 | AML/ recPrP 1/100 | AML/ recPrP 1/10 | recPrP seul |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| Ra (nm) | 48 | 69,6 | 123,9 | 134,4 | 1,11 |
| RMS (nm) | 58,7 | 82,8 | 149 | 163,1 | 1,95 |
| Hauteur moyenne | 217,7 | 233,3 | 408,7 | 469,8 | 5,4 |
| Valeur maximale de hauteur | 448,9 | 484,3 | 894,66 | 1056,9 | 43,17 |

$$R_a = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |z_i - \bar{z}|$$

5

(Formule A)

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (z_i - \bar{z})^2}$$

(Formule B)

10

$$Avg Height = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i$$

(Formule C)

Les valeurs de rugosité calculées sont obtenues par le logiciel du Thermomicroscope SPML 5.01. La rugosité moyenne Ra est définie comme la moyenne arithmétique des déviations de hauteur (formule A), la racine moyenne de la rugosité carrée (root mean square roughness RMS) est définie comme la racine carrée de la valeur moyenne des carrés des distances des points à la valeur moyenne d'image (formule B) et la hauteur moyenne de l'échantillon (formule C).

Exemple 3 : Détection de PrP recombinante en utilisant le C6S greffé à un support solide

3.1 Détection de PrP recombinante bovine sur plaques

25

a) protocole

Le protocole employé dans cette expérience est calqué sur celui réalisé dans un ELISA classique.

Selon l'exemple 1, le greffage des plaques amine activées (NHS) est réalisé durant 6 heures avec une gamme de Calix-6-Arènes Sulfonés (C6S) dilué dans une solution de PBS

50 mM (phosphate buffer saline). Les plaques sont ensuite rincées à l'eau distillée avant d'être saturées par une solution de PBST (PBS Tween) (0,05% lait 5% pendant 1 heure à température ambiante. Après rinçage, est déposée une solution de protéine prion (PrP) recombinante bovine diluée à une concentration de 0,25 µg/ml dans du PBST 0,05%. Elle est incubée une heure à température ambiante. La plaque est de nouveau rincée trois fois. Puis elle est incubée avec une solution d'anticorps anti-PrP marqués à la peroxydase diluée à 0,5 µg/ml dans du PBST 0,05% durant une heure à température ambiante. L'anticorps utilisé reconnaît la région définie par les acides aminés 145-154 de la PrP humaine et les régions homologues des PrP animales (AC23). Enfin, après un nouveau cycle de rinçage, est ajouté le révélateur, une solution d'OPD (ortho-phénylènediamine) qui est incubée 10 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution d'H₂SO₄. La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 495 nm.

20 b) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 5 qui montre que la densité optique (DO) mesurée en ordonnée reflète la quantité de PrP capturée par les C6S et restée accrochée après lavages. Le signal obtenu pour les différents greffages montre que la PrP recombinante bovine est bien capturée par les C6S. La PrP recombinante bovine se fixe sur les C6S greffés sur les plaques NHS.

3.2 Détection de la PrP recombinante humaine sur billes

30 a) Conditions expérimentales :

Selon l'exemple 1, les billes NHS sont tout d'abord mises en contact avec une solution de C6S diluée dans de l'eau distillée pour greffage du C6S sur les billes. Après cette période, les billes sont lavées à l'eau distillée puis

au PBST 0,05%. Une solution de PrP recombinante humaine dosée à 0,25 µg/ml dans du PBST 0,05% est préparée parallèlement. Puis on réalise une gamme de billes C6S par ajout de respectivement : 0 ; 0,1 ; 1 ; 5 et 10µl de la solution de billes pour 100µl de la solution de PrP. L'incubation dure 1 heure à 37°C, puis les billes sont séparées du surnageant par aimantation. La PrP fixée sur les billes est dosée directement à l'aide d'un anticorps marqué selon une méthode sandwich proche de la méthode ELISA.

L'anticorps de révélation marqué à la peroxydase est incubé une heure à 37°C après rinçages des billes par une solution de PBST 0,05%. Les billes sont séparées du surnageant par aimantation avant d'être de nouveau lavées puis révélées par une solution d'OPD incubée 10 minutes. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution d'H₂SO₄. L'anticorps de révélation employé est le 8D11G12 (bioMérieux, France).

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 495 nm.

b) Résultats

Les résultats de révélations sur bille sont indiqués sur la figure 6 et montrent que les C6S sont correctement greffées sans perte de fonction sur les supports NHS mais surtout gardent leur propriété de capture de la PrP recombinante de différentes espèces et amplifient même le signal obtenu avec les anticorps spécifiques de cette protéine de façon reproductible.

Exemple 4 : Détection de PrP physiologique en utilisant le C6S greffé à un support solide

4.1 Sérum humain sur billes

a) Protocole :

Selon l'exemple 1, les billes NHS sont tout d'abord mises en contact avec une solution de C6S diluée dans de

l'eau distillée pour le greffage. Après cette période, les billes sont lavées à l'eau distillée puis au PBST 0,05%.

Une gamme de sérum est préparé par dilution dans du PBS. Une solution de PrP recombinante humaine dosée à 0,25
5 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS est préparée parallèlement ainsi qu'une solution de PBST 0,05% lait 5% qui serviront respectivement de témoin positif et négatif.

Les billes sont ajoutées à raison de 5 μl d'une solution de 2.10^9 billes/ml pour 250 μl d'échantillon.
10 L'incubation dure 1 heure à 37°C sous agitation. Les billes sont ensuite séparées du surnageant par aimantation. La PrP fixée sur les billes est dosée directement à l'aide d'un anticorps marqué.

La révélation sur billes utilise un protocole proche
15 de l'ELISA. L'anticorps de révélation marqué à la peroxydase est incubé une heure à 37°C et sous agitation douce après rinçage des billes par une solution de PBST 0,05%. Les billes sont séparées du surnageant par aimantation avant d'être de nouveau lavées puis révélées par une solution
20 d'OPD incubée 10 minutes. La réaction est stoppée à l'aide d'une solution d' H_2SO_4 . L'anticorps de révélation employé est le 8D11G12.

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 495 nm.

25 b) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 7 qui met en évidence que :.

- le témoin négatif dans le lait permet d'évaluer le bruit de fond tandis que le témoin positif dans une solution
30 de PrP 0.25 $\mu\text{g/ml}$ permet de vérifier que l'expérience a fonctionné et est interprétable.

- les C6S greffées sur les billes NHS capturent la PrP physiologique présente dans le sérum humain. De plus, la capture est meilleure lorsque la dilution du sérum est

augmentée avec un plateau de saturation atteint pour les dilutions au $1/5^{ème}$ et au $1/10^{ème}$.

c) Conclusion

De façon surprenante, les C6S greffées sur billes NHS
5 capturent la PrP physiologique présente dans le sérum humain. Les dilutions du sérum permettent d'augmenter le signal obtenu sur les billes.

4.2 Liquide Céphalorachidien (LCR) humain sur plaques

a) Conditions expérimentales :

10 Les échantillons de LCR sont tout d'abord répartis en tubes de volume équivalents. Deux points de dilution : pur et au $1/2$ sont réalisés pour chaque échantillon. Puis ceux-ci sont soumis à trois types de traitement par la chaleur : 30 minutes à 56°C , 15 minutes à 75°C ou 5 minutes à 95°C . Un
15 témoin sans chauffage est réalisé en parallèle pour les échantillons purs.

Selon l'exemple 1, parallèlement, les plaques NHS sont mises en contact durant 6 heures avec une solution de C6S diluée dans une solution de PBS 50 mM pour le greffage.

20 Les plaques sont ensuite rincées à l'eau distillée puis au PBST 0,05%.

Les échantillons sont alors déposés et incubés une nuit à $2-8^{\circ}\text{C}$. La plaque est ensuite rincée six fois. Puis elle est incubée avec une solution d'anticorps anti-PrP
25 marqués à la biotine diluée à $0,5 \mu\text{g/ml}$ dans du PBST 0,05% durant une heure à température ambiante. L'anticorps utilisé est le AC23.

Après un nouveau cycle de rinçage, est ajoutée une solution de Streptavidine-PAL (Phosphatase Alcaline) qui est
30 incubée 20 minutes à température ambiante. La plaque est une dernière fois rincée et la solution de révélation de PNPP est déposée et incubée 30 minutes à 37°C . La réaction est stoppée à l'aide d'une solution de NaOH 0,4N.

La lecture du signal obtenu est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm contre un filtre à 490 nm.

b) Résultats :

Les résultats sont indiqués sur la figure 8 qui met en évidence que la PrP physiologique peut être dosée dans le LCR.

Exemple 5 : Détection de PrP^{sc} dans le cerveau en utilisant le C6S greffé à un support solide

10 5.1 Détection sur plaque

a) Conditions expérimentales :

La première étape consiste à obtenir de la PrP^{sc} purifiée par extraction à partir de cerveaux de patients atteints ou non de la maladie de Creutzfeld-Jakob (MJC). Un échantillon de 260 mg de chaque cerveau est prélevé puis broyé afin d'obtenir un homogénat 10% en glucose 5%. Le broyat est ensuite filtré à l'aide d'une aiguille. Puis vient une étape de digestion par la protéinase K. Elle est utilisée à la concentration de 20 µg pour 100 mg de tissu à 37°C pendant 1 heure. Ensuite, 650 µl d'une solution de Sarkosyl 30% sont ajoutés. En parallèle, un coussin de saccharose de 400 µl est déposé au fond d'un tube pour ultracentrifugation. L'échantillon est ensuite déposé sur ce coussin. Les tubes sont complétés avant d'être soudés puis ultracentrifugés 2 heures à 20°C à 100 000 rpm. Les surnageants sont éliminés et les parois des tubes sont grossièrement séchées avec du papier absorbant. Les culots sont ensuite repris dans du Tris-Maléate. Les échantillons sont alors chauffés 5 minutes à 95°C puis centrifugés 15 minutes à 12 000 rpm à 20°C. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à leur prochaine utilisation. La réussite de cette première étape a été confirmée par Western Blot.

b) Test sur plaques Calix-6-Sulphonates

Selon l'exemple 1, le greffage des plaques NHS est réalisé durant 6 heures avec une gamme de C6S dilué dans une solution de PBS 50 mM. Elles sont tout d'abord saturées par une solution de PBST 0,05% lait 5% durant 6 heures à température ambiante. Puis elles sont lavées trois fois par une solution de PBST 0,05%. L'échantillon préalablement dilué en tris maléate est déposé sur la plaque et incubé une nuit à 2-8°C. La plaque est ensuite lavée 6 fois en PBST 0,05%. La solution d'anticorps de révélation est incubée 1 heure à température ambiante. Après une nouvelle série de lavage est incubée la streptavidine-PAL durant 20 minutes. La plaque est lavée une dernière fois avant le dépôt de PNPP (para-nitrophénylphosphate) qui est incubé 30 minutes à 37°C. Puis la réaction de révélation est stoppée par ajout de soude.

La lecture de la DO est effectuée à 405 nm contre un filtre à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

c) Résultats

Les résultats sont indiqués sur la figure 9 qui montre que, de façon surprenante, la PrP^{sc} des échantillons issus de patients atteints de la maladie de Creutzfeld-Jakob est détectable par le procédé de l'invention utilisant une capture par des C6S greffées sur plaques NHS et une détection par un anticorps dirigé spécifiquement contre la protéine PrP, ceci étant validé par les témoins positifs PrP recombinante humaine et négatifs PBST 0,05%.

Exemple 6 : Détection de PrP^{sc} dans le LCR en utilisant le C6S greffé à un support solide

6.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont constitués de prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR) de préférence non hémolysés et sans débris cellulaires. Ces prélèvements sont anonymes et sont conservés congelés à -(80°C) dans des tubes à parois

faiblement adsorptives pour les protéines (« Pre-lubricated micro centrifuge tube 1,7 mL », Marsh Biomedical Products, réf. T6050G).

Ils se répartissent en deux catégories :

5 D'une part, les échantillons positifs pour la MJC.

Ce sont des LCR post-mortem, récupérés lors de l'autopsie par ponction dans les citernes, et dont la recherche de la PrP^{sc} dans le tissu cérébral par western blot a permis de confirmer le diagnostic de la MJC (cas
10 certains). Lors de l'autopsie, le LCR prélevé est immédiatement réparti dans les tubes décrits précédemment, sans centrifugation au préalable (à l'exception des échantillons présentant des débris cellulaires en quantité importante), et les aliquotes sont congelés à -80°C.

15 D'autre part, les échantillons négatifs pour la MJC. Ils sont de 2 types :

LCR post-mortem récupérés lors de l'autopsie et dont la recherche de la PrP^{sc} dans le tissu cérébral par western blot a permis d'éliminer le diagnostic de la MJC (témoins
20 négatifs pour la MJC)

LCR de patients non atteints de MJC et issus de dérivations ventriculaires externes (DVE). Les conditions de stockage de ces prélèvements sont identiques à celles décrites précédemment.

25 6.2 Approche ELISA

a) principe analytique

Les échantillons sont simplement incubés à température élevée pendant un temps donné puis, après refroidissement, ils sont dilués au 1/2 ou au 1/5 dans un tampon compatible
30 avec une analyse immunométrique (ELISA) (tampon Tris-Maléate pH 8). Lorsque la digestion par la protéinase K intervient avant le dépôt sur plaque C6S, les échantillons sont digérés par la protéinase K pendant 15 minutes puis sont déposés ainsi sur plaque C6S sans inhibition au préalable.

Le terme ELISA est employé bien que la capture ne soit pas immunologique car il s'agit d'une réaction de type ligand/affinant avec révélation immunologique.

Les techniques ELISA sont des techniques immuno-
5 enzymologiques quantitatives, permettant de doser l'antigène recherché par la transformation d'un substrat en un produit soluble mesurable et proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. La technique utilisée ici
10 comporte les mêmes étapes qu'un ELISA sandwich non compétitif classique à l'exception de la sensibilisation des cupules. En effet, l'anticorps anti-prion de capture est remplacé par les Calix-6-Arènes sulfonés, greffés sur les groupements NHS des microplaques par leur fonction amine.

Après immobilisation des C6S au fond des cupules d'une
15 microplaque et saturation des sites non spécifiques de fixation de l'antigène, l'échantillon est déposé et la plaque est incubée pour permettre la liaison de l'antigène avec le C6S. Puis, après plusieurs lavages, l'anticorps de révélation, spécifique de la protéine prion et marqué, est
20 ajouté. Les complexes formés sont visualisés par méthode colorimétrique, après ajout du substrat de l'enzyme, qui se transforme en produit coloré, dont l'absorbance est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaque (spectrophotomètre automatisé).

25 b) Mode opératoire

Un volume de LCR est incubé au bain-marie sec à 75°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, l'échantillon est dilué 5 fois dans du tampon Tris-Maléate 0,2 M, pH 8 (ajout
30 de 4 volumes de tampon) et est, soit déposé directement sur une microplaque sensibilisée au préalable par les C6S, soit digéré par la protéinase K pendant 15 minutes à 37°C, puis déposé sur microplaque.

Les étapes successives de l'analyse immunométrique sont énumérées ci-dessous dans l'ordre chronologique :

1 - Le greffage des Calix-6-arènes sulfonés C6S sur les plaques amine activées (NHS) est réalisé suivant la méthode mentionnée ci-dessus durant 6 heures à température ambiante selon une gamme de concentration ou selon une
5 concentration fixe, dilués dans une solution de PBS 50 mM.

2 - Les plaques sont ensuite lavées 3 fois en PBST 0,05% puis saturées en PBST 0,05%-Lait 5% pendant 1 heure à 37°C.

3 - Après lavage, 100 µL de LCR préparé selon le
10 principe analytique décrit ci-dessus sont déposés par puits ; les plaques sont incubées pendant 1h30 à 37°C.

4 - Après lavage, 100 µL de l'anticorps de révélation sont déposés par puits (AC23-HRP, HRP pour peroxydase de raifort, à 0,5 µg/mL ou AC23-Biotine à 0,5 µg/mL). Les
15 plaques sont incubées pendant 1 heure à température ambiante.

5 - Après lavage, les complexes formés sont révélés :

5.1 - Si l'anticorps de révélation est couplé à la biotine, 100 µL d'une solution de SA-PAL diluée au 1/20000
20 en tampon PBST 0,05% sont déposés par puits. Les plaques sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Après lavage, 100 µL de PNPP sont déposés par puits. Les plaques sont incubées pendant 10 à 30 minutes à 37°C. A l'issue de l'incubation, la réaction colorimétrique est
25 stoppée par l'ajout dans chaque puits de 50 µL de NaOH à 0,4 N. La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 405 nm contre un filtre à 450 nm.

5.2 - Si l'anticorps de révélation est couplé à la peroxydase, 100 µL d'OPD sont déposés par puits. Les plaques
30 sont incubées pendant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

A l'issue de l'incubation, la réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout dans chaque puits de 50 µL d'H₂SO₄ à

1,8 N. La densité optique est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 495 nm.

b) Résultats

1 - Vérification de l'association des Calix-6-Arènes sulfonés mono-amines (C6S) greffés sur microplaque avec la protéine prion du liquide céphalo-rachidien (LCR) :

Un liquide céphalo-rachidien de patient non atteint de la maladie de Creutzfeld-Jakob est chauffé pendant 15 minutes à 75°C et est ensuite dilué au 1/2 ou au 1/6 dans un tampon compatible avec une révélation immunologique en ELISA. Les échantillons ne sont pas digérés par la protéinase K et sont déposés ainsi sur une plaque greffée avec des C6S selon une gamme de concentration comprise entre 1,8 et 18 µg/mL. Après incubation, la révélation immunologique de l'antigène capturé sur les C6S est assurée par l'anticorps AC23 couplé à la peroxydase, utilisé à 0,5 µg/mL. Les résultats sont présentés sur la figure 10.

Ces résultats montrent que les C6S s'associent bien avec une forme de protéine prion dans le LCR puisqu'un signal est observé dès la première concentration de C6S immobilisés au fond des cupules.

2 - Vérification de l'association des C6S avec la protéine prion pathologique en phase hétérogène sans utilisation de protéinase K:

Un LCR de patient non atteint de MJJ (LCR-) et un LCR de patient décédé de MJC (MJC+) non dilués ou dilués au 1/2 subissent différents types de traitement par la chaleur. Ils sont ensuite déposés sur plaque greffée avec les C6S à 7,2 µg/mL. Après lavage, la révélation immunologique est assurée par l'anticorps anti-prion AC23 couplé à la biotine.

Les résultats sont représentés graphiquement en figure 11.

Ces résultats montrent une adsorption de la protéine prion sur les C6S greffés sur la plaque en absence de

traitement par la protéinase K plus efficace pour l'échantillon positif que pour l'échantillon négatif. Les différents traitements par la chaleur influencent légèrement l'efficacité d'adsorption de la protéine prion sur les C6S en absence de dilution et davantage lorsque l'échantillon est dilué. Ainsi, les conditions expérimentales favorisant l'adsorption de la protéine prion sur les C6S MN en phase hétérogène semblent être une dilution des échantillons et un traitement pendant 5 minutes à 95°C.

10 3 - Vérification de l'association des C6S avec la protéine prion pathologique en phase hétérogène avec utilisation de protéinase K:

On a utilisé une étape de digestion par la protéinase K pendant 15 minutes à 37°C en traitement pré-analytique, avant capture sur plaque C6S du mélange digestif pendant 1 heure à 37°C. L'élimination de la protéinase K résiduelle est assurée par des lavages successifs en tampon PBS-Tween 0,05%.

Les résultats sont indiqués sur la figure 12.

20 Ces résultats montrent une différence de densité optique en faveur de l'échantillon positif pour la MJC après digestion par la protéinase K. Ce différentiel est visible dès la première concentration de protéinase K testée (0,5 µg/mL).

25 d) Conclusion

La détection de la protéine prion dans le LCR est rendue possible selon le procédé de l'invention. En effet, en absence de digestion par la protéinase K, la détection de la PrP totale (cellulaire et pathologique) est amplifiée en présence des Calix-6-Arènes sulfonés et, de façon inattendue, la PrP^{sc} est préférentiellement détectée. L'utilisation de ces C6S en capture, après digestion des échantillons par la protéinase K, permet de détecter la PrP^{sc} du LCR en fournissant un signal significativement

différent entre les LCR issus de patients non atteints de MJC et les LCR issus de patients atteints de MJC.

REVENDICATIONS

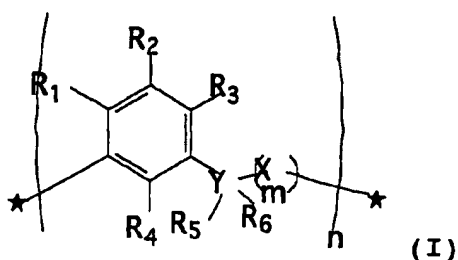
1. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc}, caractérisé en ce que l'on ajoute dans un échantillon biologique susceptible de contenir de la PrP^{sc}, un ligand adjuvant macrocyclique (AML) libre ou lié à un support, puis on fait réagir la suspension résultante avec un anticorps anti-PrP^{sc}, et on détecte la présence de PrP.
2. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend l'étape supplémentaire de traitement de l'échantillon avec de la protéinase K avant ou après contact avec l'AML.
3. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit échantillon biologique provient d'un animal, y compris l'homme.
4. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit échantillon est un tissu ou un fluide biologique, notamment le liquide céphalo-rachidien ou le sérum.
5. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit support solide est de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH₂ et est de préférence une bille magnétique ou une microplaque.
6. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que ledit ligand adjuvant macrocyclique se

lie à des sites contigus ou proches dans l'espace des sites de liaison de la PrP^{sc} avec un anticorps.

7. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le ligand adjuvant macrocyclique est choisi dans la famille des métacyclophanes et en particulier parmi les calix-arènes.

8. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon la revendication 7, caractérisé en ce que les calix-arènes préférés sont les para-sulfoanto-calix-arènes fonctionnalisés sur la face phénolique, de préférence le p-sulphonato-calix-[4]-arène, le p-sulphonato-calix-[6]-arène, le p-sulphonato-calix-[8]-arène, ou l'un de leurs dérivés.

9. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le ligand adjuvant macrocyclique répond à la formule générale (I) ci-dessous



dans laquelle

25 R_1 représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR, R étant tel que défini ci-dessous,

R_2 représente un atome d'hydrogène, un groupe R, COR, Pol, CH₂Pol, dans lesquels Pol représente un groupe

phosphate, sulfate, amine, ammonium, acide carboxylique et R est tel que défini ci-dessous,

R₃ représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR ou un groupe OCOR dans lesquels R
5 est tel que défini ci-dessous,

R₄ représente un atome d'hydrogène, un groupe hydroxyle, un groupe OR, un groupe OCH₂R ou un groupe OCOR, dans lesquels R est tel que défini ci-dessous,

Y est un atome de carbone, d'azote, ou un atome de
10 soufre,

R₅ et R₆, chacun indépendamment, sont absents ou représentent un atome d'hydrogène, un groupement CH₂ ou R tel que défini ci-dessous, ou bien

R₅ et R₆ représentent ensemble un atome d'oxygène ou
15 de soufre,

X représente un groupement CH₂, ou un atome d'oxygène ou de soufre,

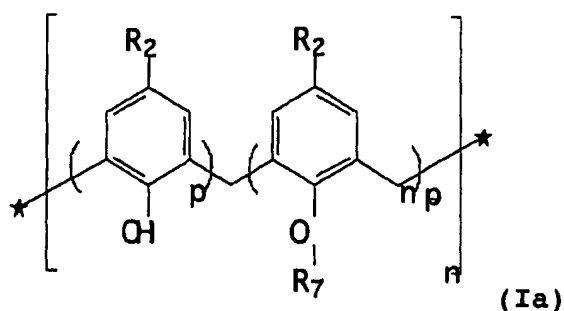
m représente un entier égal à 0 ou 1,

R représente un atome d'hydrogène ou une chaîne
20 hydrocarbonée, saturée ou non, ramifiée ou non, cyclique ou non cyclique, substituée ou non par un groupement halogène, et portant des fonctions polaires ou non polaires,

n est un entier compris entre 3 et 15,

les substituants R₁ à R₅, R, X, Y et l'entier m
25 peuvent être de nature différente suivant les motifs.

10. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand adjuvant macrocyclique
30 répond à la formule générale (Ia) ci-dessous



dans laquelle

chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate ,

5 R_7 est un groupement $(CH_2)_r-Z$ dans lequel Z est un groupement COOEt, COOH, CN ou NH_2 ,

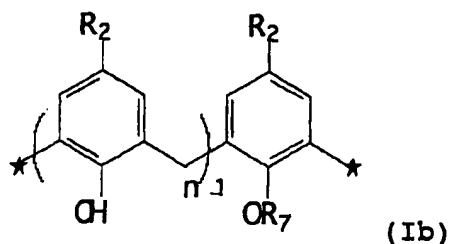
r est un entier compris entre 1 et 20,

p est un entier compris entre 1 et 10,

n est un entier compris entre 2 et 10.

10

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit ligand répond à la formule (Ib) ci-dessous :



dans laquelle

15 n est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

R_7 représente un groupement $(CH_2)_t-(CO)_s-(NH_2)$ ou un groupement $(CH_2)_t-COOH$ où t est un entier compris entre 0 et 20 6 et s est un entier compris entre 0 et 6.

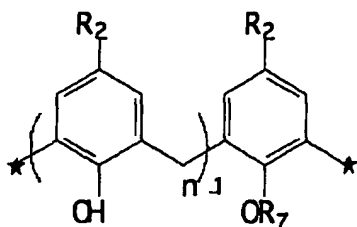
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit ligand est un calix-arène de formule (Ib) dans lequel les deux groupements R_2 sont chacun un

groupement sulfate, n est 4, 6 ou 8, et R_6 est un atome d'hydrogène, un groupement CH_2COOH , un groupement CH_2CONH_2 ou un groupement $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$.

5 13. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit ligand est tel que les deux groupements R_2 sont chacun un groupement sulfate, n est un entier égal à 6, et R_6 est un groupement $(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$.

10 14. Procédé de détection de la PrP, et en particulier de la PrP^{sc} selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que ledit calixarène est lié à un support fonctionnalisé notamment au moyen d'une fonction NHS ou NH_2 .

15 15. Ligand adjuvant macrocyclique greffé sur un support fonctionnalisé, dans lequel le ligand répond à la formule (Ib)



20

(Ib)

25 dans laquelle dans laquelle n est un entier compris entre 4 et 8,

chaque groupement R_2 , pris indépendamment, est un groupement sulfate ou un groupement phosphate,

R_6 représente un groupement $(\text{CH}_2)_t\text{-(CO)}_s\text{-(NH}_2)$ ou un groupement $(\text{CH}_2)_t\text{-COOH}$ où t est un entier compris entre 0 et 30 6 et s est un entier compris entre 0 et 6,

et le support est du type support solide de préférence fonctionnalisé par un groupe NHS ou un groupe NH₂ et est de préférence une bille magnétique ou une microplaque.

5

16. Utilisation d'un ligand adjuvant macrocyclique pour la fabrication d'une composition destinée à la détection de la PrP, de la PrP recombinante, physiologique ou pathologique, bovine ou humaine ou d'autres espèces, PrP^{sc} dans un échantillon biologique, notamment un fluide biologique, et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

15 17. Kit de diagnostic des maladies dont le PrP^{sc} est responsable, du type ESB, la tremblante de petits ruminants, Creutzfeld-Jakob, caractérisé en ce qu'il comprend un ligand adjuvant macrocyclique, et en particulier d'un ligand de formule (I), (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les
20 revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

18. Kit de dosage immunologique de la PrP^{sc} caractérisé en ce qu'il comprend un ligand adjuvant macrocyclique, et en particulier d'un ligand de formule (I),
25 (Ia) ou (Ib) tel que défini dans les revendications 9, 10 et 15 libre ou lié à un support.

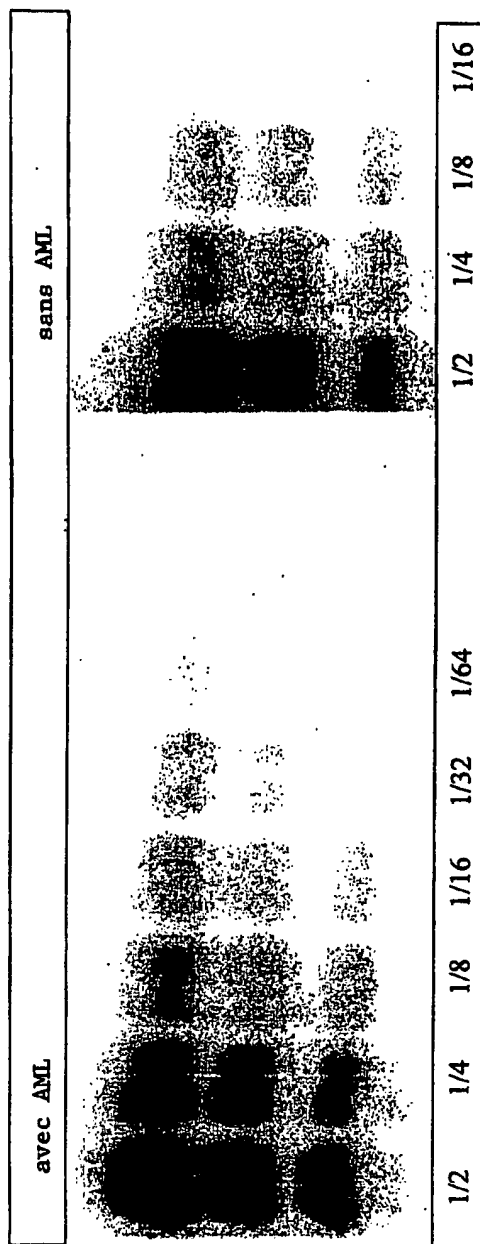


Figure 1

2/11

| | Avec AML | | | | | Sans AML | |
|----------|----------|------|------|------|---|----------|------|
| Dilution | 1/8 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | | 1 / 4 | 1/8 |
| Ligne | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | 4257 | 1883 | 1331 | 538 | | 3074 | 1081 |
| | 3162 | 1190 | 761 | | | 2067 | 787 |
| | 1503 | 426 | 355 | | | 1184 | 501 |

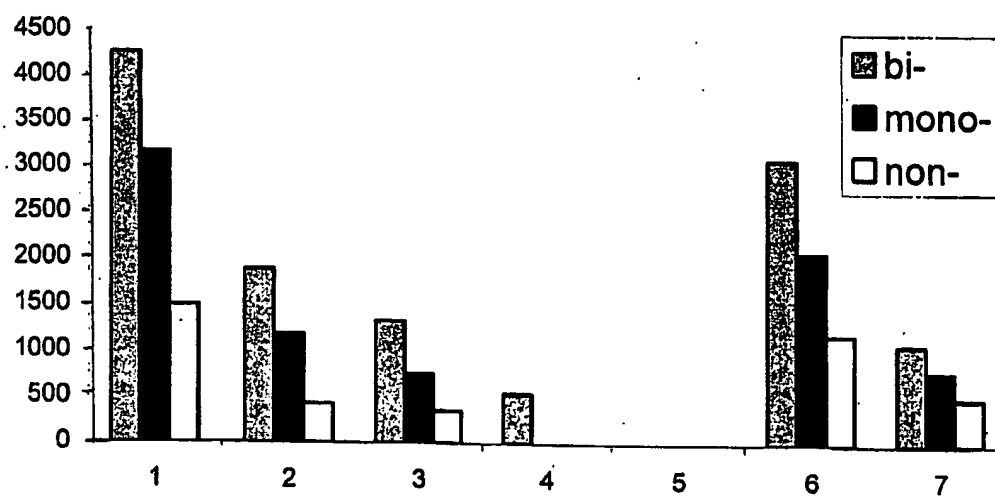


Figure 2

3/11

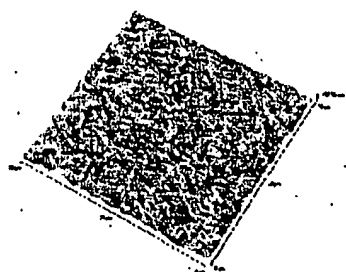


Figure 3 A

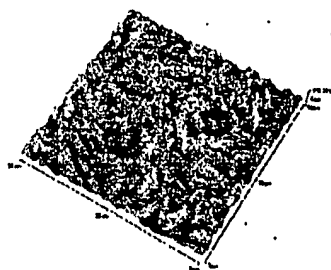


Figure 3 B



Figure 3 C

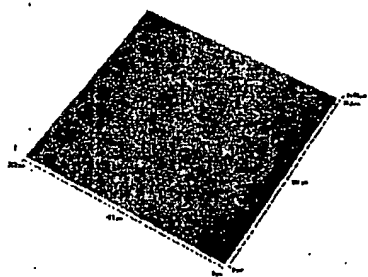


Figure 4 A

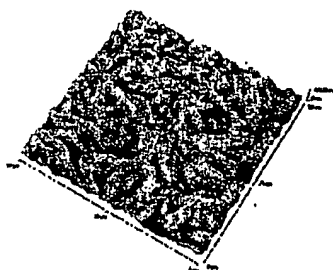


Figure 4 B

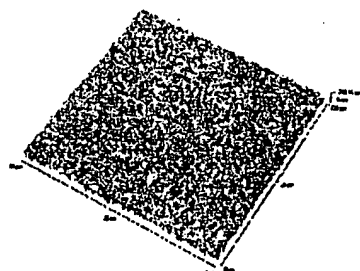
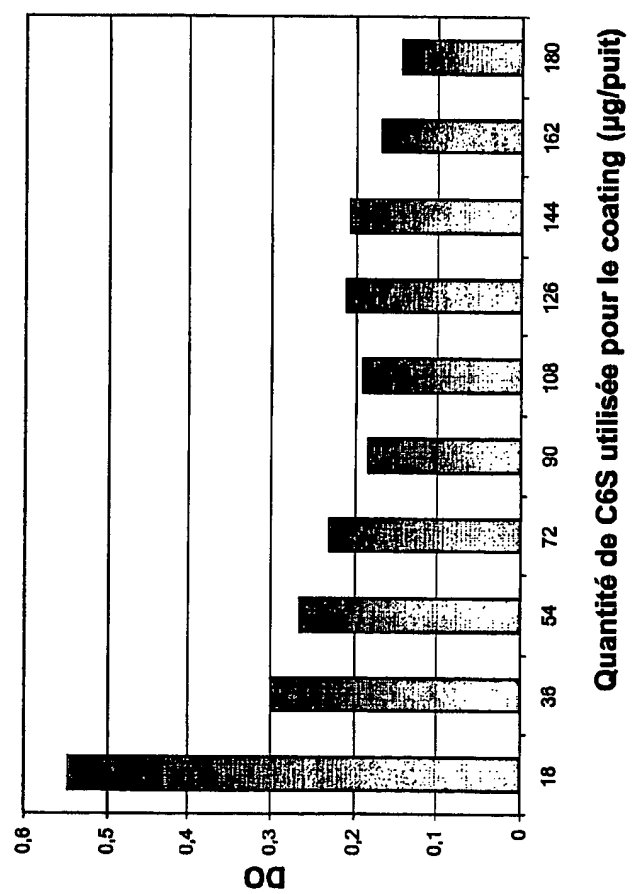


Figure 4 C

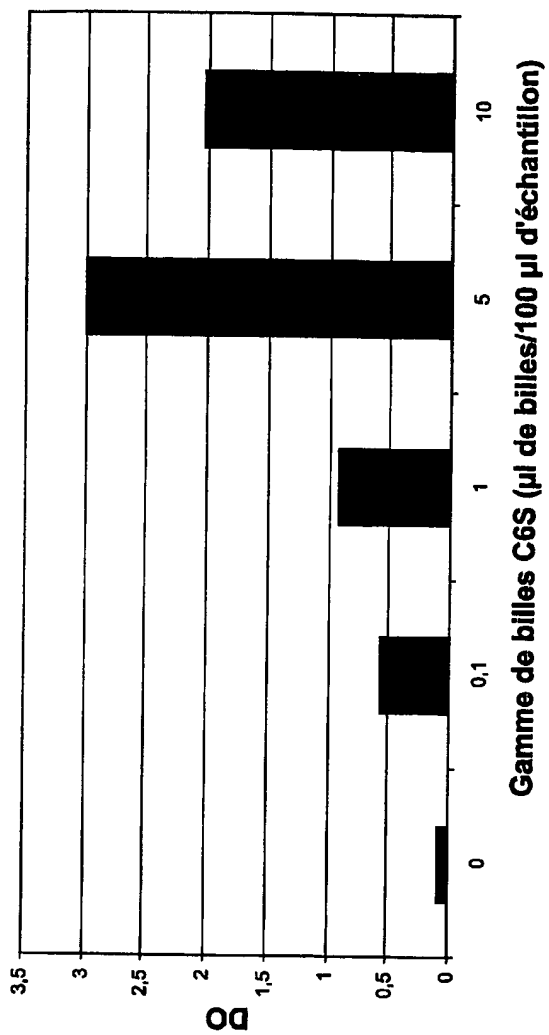
4/11

Figure 5



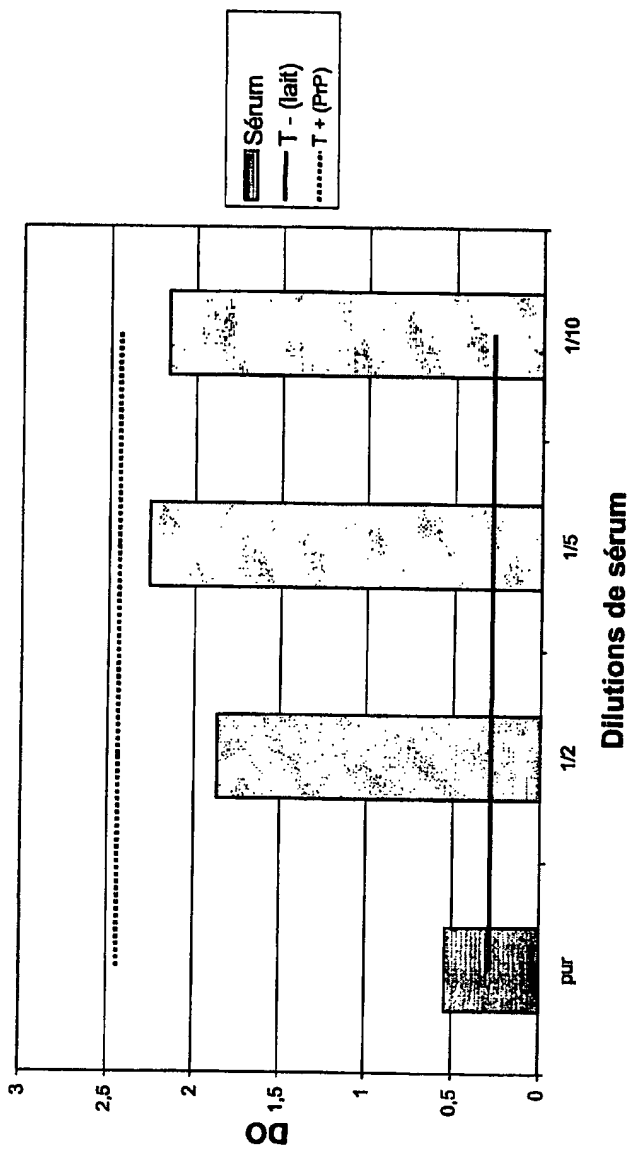
5/11

Figure 6



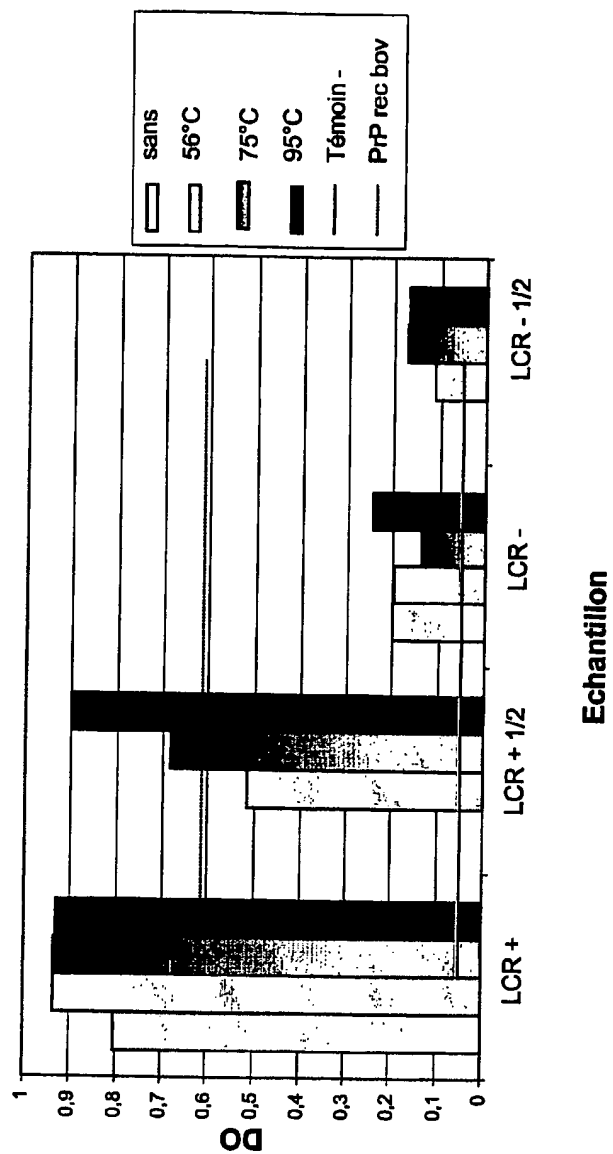
6/11

Figure 7



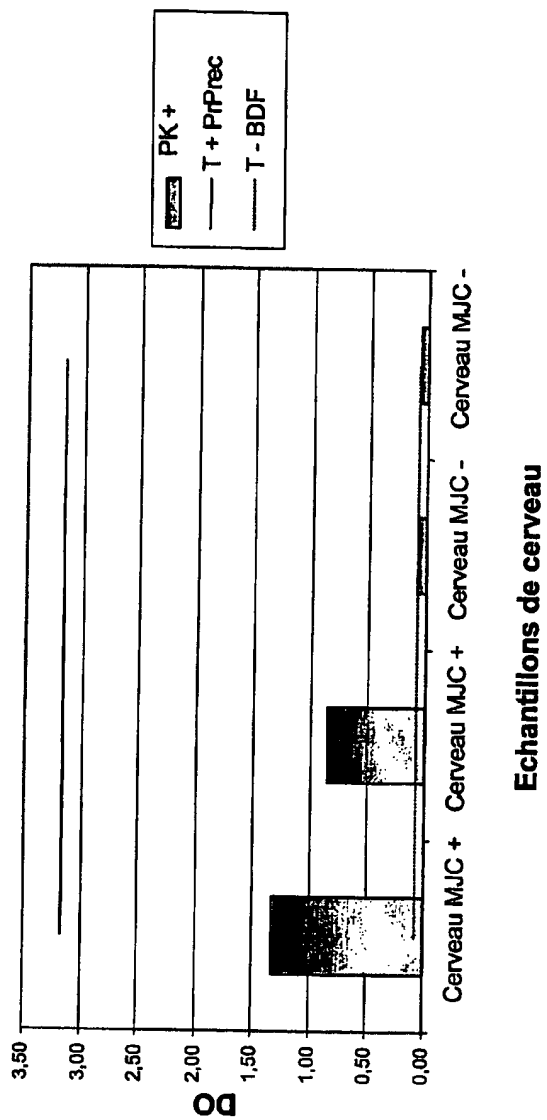
7/11

Figure 8



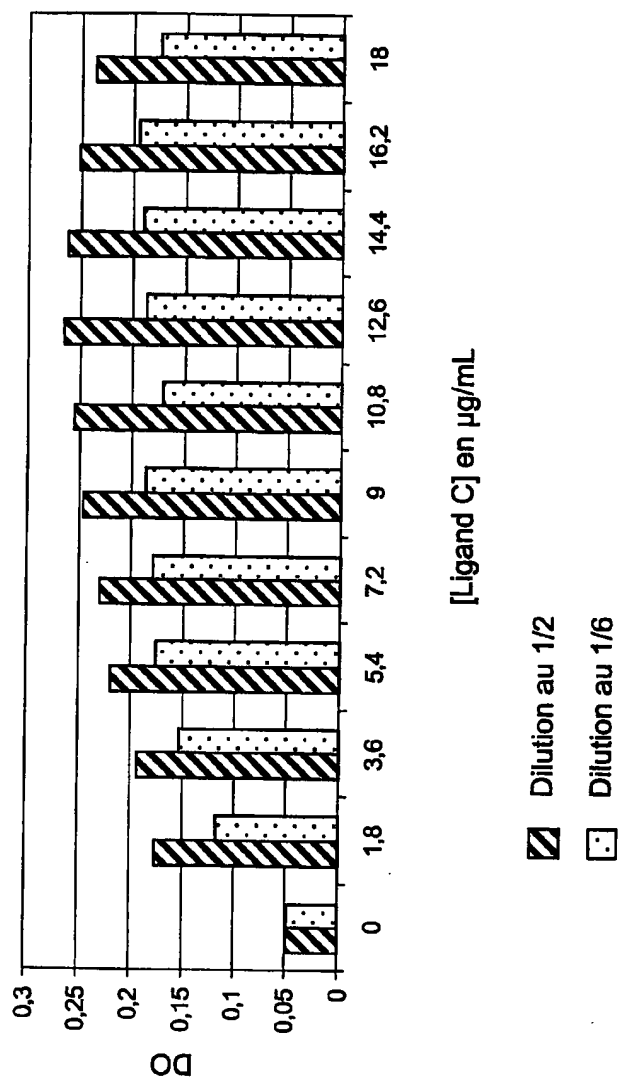
8/11

Figure 9



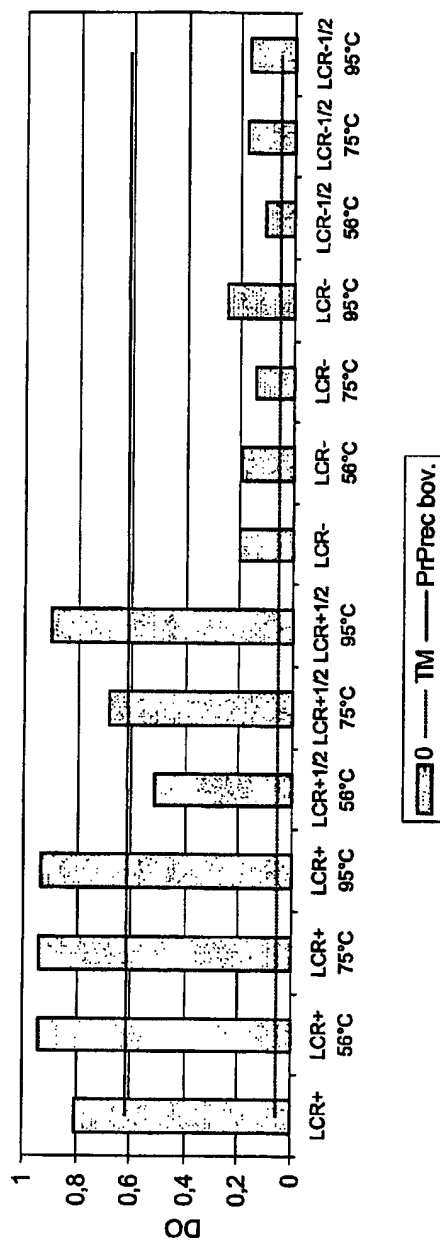
9/11

Figure 10



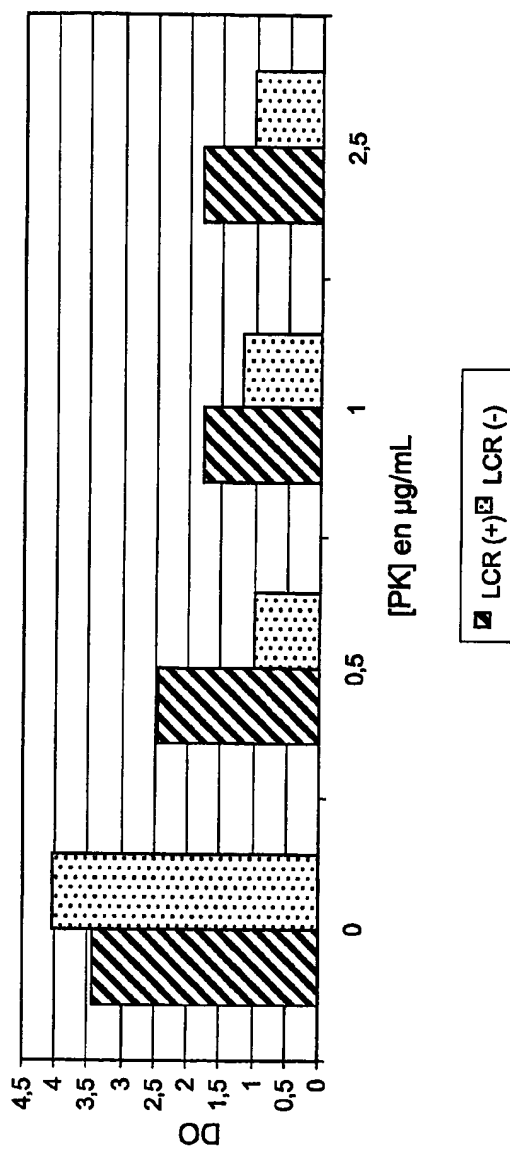
10/11

Figure 11



11/11

Figure 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03857

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7. G01N33/68 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ;PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 October 2002 (2002-10-31) cited in the application the whole document | 1 |
| A | WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 April 2001 (2001-04-05) abstract | 1 |
| A | WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ;CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 October 2001 (2001-10-18) abstract | 1 |
| | --- -/- | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2004

Date of mailing of the international search report

25/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03857

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) | 1 |
| X | 5 November 1996 (1996-11-05) abstract | 15 |
| A | WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 October 1997 (1997-10-16) abstract; examples | 1, 15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/03857

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 02086511 | A | 31-10-2002 | DE 10119713 A1 | 24-10-2002 |
| | | | CA 2437880 A1 | 31-10-2002 |
| | | | WO 02086511 A2 | 31-10-2002 |
| | | | EP 1381868 A2 | 21-01-2004 |
| WO 0123425 | A | 05-04-2001 | AU 5241100 A | 30-04-2001 |
| | | | CA 2385743 A1 | 05-04-2001 |
| | | | EP 1216258 A1 | 26-06-2002 |
| | | | WO 0123425 A1 | 05-04-2001 |
| | | | JP 2003514773 T | 22-04-2003 |
| | | | US 2002004586 A1 | 10-01-2002 |
| | | | US 2001053533 A1 | 20-12-2001 |
| WO 0177687 | A | 18-10-2001 | AU 5135801 A | 23-10-2001 |
| | | | CA 2405568 A1 | 18-10-2001 |
| | | | EP 1272509 A2 | 08-01-2003 |
| | | | JP 2003530554 T | 14-10-2003 |
| | | | WO 0177687 A2 | 18-10-2001 |
| US 5571911 | A | 05-11-1996 | US 5342934 A | 30-08-1994 |
| | | | WO 9400455 A1 | 06-01-1994 |
| | | | US 5599926 A | 04-02-1997 |
| WO 9737995 | A | 16-10-1997 | AU 2440997 A | 29-10-1997 |
| | | | CA 2251072 A1 | 16-10-1997 |
| | | | CA 2391030 A1 | 16-10-1997 |
| | | | EP 0891364 A1 | 20-01-1999 |
| | | | JP 2000511880 T | 12-09-2000 |
| | | | WO 9737995 A1 | 16-10-1997 |
| | | | US 6262257 B1 | 17-07-2001 |
| | | | US 2002026047 A1 | 28-02-2002 |
| | | | US 2002115566 A1 | 22-08-2002 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  de Internationale No
PCT/FR 03/03857

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/68 C12Q1/37 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE | | |
| Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | WO 02/086511 A (OESCH BRUNO ;PRIONICS AG (CH); BIFFIGER KARIN (CH); MOSER MARKUS () 31 octobre 2002 (2002-10-31) cité dans la demande le document en entier | 1 |
| A | WO 01/23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 avril 2001 (2001-04-05) abrégé | 1 |
| A | WO 01/77687 A (WILTSHIRE VITE ROSE ;CARBONELL RUBEN (US); HAMMOND DAVID J (US); S) 18 octobre 2001 (2001-10-18) abrégé | 1 |
| -/-- | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> | | |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">12 mai 2004</div> | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25/05/2004</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Moreno, C</div> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... de internationale No
PCT/FR 03/03857

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | US 5 571 911 A (STILL W CLARK ET AL) 5 novembre 1996 (1996-11-05) | 1 |
| X | abrégé | 15 |
| A | WO 97/37995 A (UNIV TEXAS) 16 octobre 1997 (1997-10-16) abrégé; exemples | 1,15 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De... Internationale No
PCT/FR 03/03857

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|------------------------|--|--|
| WO 02086511 | A | 31-10-2002 | DE 10119713 A1 CA 2437880 A1 WO 02086511 A2 EP 1381868 A2 | 24-10-2002 31-10-2002 31-10-2002 21-01-2004 |
| WO 0123425 | A | 05-04-2001 | AU 5241100 A CA 2385743 A1 EP 1216258 A1 WO 0123425 A1 JP 2003514773 T US 2002004586 A1 US 2001053533 A1 | 30-04-2001 05-04-2001 26-06-2002 05-04-2001 22-04-2003 10-01-2002 20-12-2001 |
| WO 0177687 | A | 18-10-2001 | AU 5135801 A CA 2405568 A1 EP 1272509 A2 JP 2003530554 T WO 0177687 A2 | 23-10-2001 18-10-2001 08-01-2003 14-10-2003 18-10-2001 |
| US 5571911 | A | 05-11-1996 | US 5342934 A WO 9400455 A1 US 5599926 A | 30-08-1994 06-01-1994 04-02-1997 |
| WO 9737995 | A | 16-10-1997 | AU 2440997 A CA 2251072 A1 CA 2391030 A1 EP 0891364 A1 JP 2000511880 T WO 9737995 A1 US 6262257 B1 US 2002026047 A1 US 2002115566 A1 | 29-10-1997 16-10-1997 16-10-1997 20-01-1999 12-09-2000 16-10-1997 17-07-2001 28-02-2002 22-08-2002 |